Les infections à staphylocoques sont ubiquitaires et représentent un pourcentage important des infections graves.

Considérés depuis des années comme des germes commensaux de la peau et des muqueuses, les staphylocoques coagulase négative sont actuellement reconnus comme des agents majeurs d'infections nosocomiales.

La pathogénicité des staphylocoques pose peu de problèmes en ce qui concerne *Staphylococcus aureus* mais elle est plus discutée pour les staphylocoques coagulase négative.

D'indéniables infections nosocomiales causées par ces staphylocoques « non pathogènes » ont suscité des travaux visant à les identifier et à les classer.

Les streptocoques non groupables sont des commensaux de la cavité buccale (dont ils représentent 30 à 60 % de la flore bactérienne), de l'intestin, de la peau et des voies génitales. Ces streptocoques jouent un rôle étiologique prédominant dans la formation des caries dentaires et des parodontopathies.

En outre, ces streptocoques sont fréquemment rencontrés dans les infections du tractus respiratoire, dans les abcès pulmonaires (*Streptococcus milleri*), ostéomyélites, arthrites et pleurésie **[17, 30, 64]**.

Malgré ce rôle pathogène devenu évident, la bonne identification de ces genres n'était pas souvent possible en routine dans les laboratoires.

En effet, la mise au point et la simplification des schémas d'identification biochimique n'a pas pu résoudre le problème puisque cette méthode présentait l'inconvénient de nécessiter le recours à un grand nombre de réactions biochimiques, à des milieux spécifiques et à des temps d'incubation très longs **[1]**.

Ainsi, le but de notre travail était d'élaborer des algorithmes qui permettent une identification correcte, rapide et précise des staphylocoques à coagulase négative et des streptocoques non groupables. Cela rendra le travail de routine plus rapide, plus fiable et plus accessible financièrement aux populations, même les plus démunies.

I - LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE

I.1. -DEFINITION

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif classiquement disposés en amas, immobiles, non sporulés.

Actuellement on distingue 44 espèces. L'espèce *Staphylococcus aureus* se distingue généralement des autres staphylocoques à coagulase négative par la présence d'une coagulase.

I.2. – TAXONOMIE

1.2.1. - Historique [42]

Les staphylocoques ont été l'objet de nombreuses investigations menées par d'éminents microbiologistes à l'instar de KOCH, PASTEUR, OGSTON et ROSENBACH.

En 1878, KOCH souligne le rôle pathogène de bactéries se présentant sous forme de cocci Gram positif. Ces cocci seront ensuite isolés puis identifiés d'un pus par Louis Pasteur en 1880.

Ils seront baptisés en 1883 par Ogston sous le nom de staphylocoques, du latin « staphylle » ou grappe et coccus ou « grain ».

En 1884, ils sont classés en fonction de la pigmentation des colonies par ROSENBACH en *Staphylococcus aureus* du latin « orange » et *Staphylococcus albus*, du latin « blanche ».

1.2.2. – Habitat [13]

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud.

Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement. Le site de colonisation préférentielle de *Staphylococcus aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale.

Les staphylocoques à coagulase négative représentent les principaux commensaux de la peau avec les corynébactéries et les propionibactéries. La densité de colonisation est plus importante au niveau des zones humides (partie antérieure des narines, périnée, creux axillaires et les plis inguinaux).

Les staphylocoques à coagulase négative sont en règle générale des bactéries opportunistes essentiellement responsables d'infections nosocomiales.

1.2.3. – Classification [3, 20, 25, 48, 50]

Les staphylocoques appartiennent à la famille des *Micrococcaceae* qui comprend quatre genres : *Micrococcus, Staphylococcus, Stomatococcus et Planococcus.*

■ **Le genre *Micrococcus***

Il comprend des microcoques qui sont également des hôtes normaux de la peau et des muqueuses de l'homme et par conséquent souvent présents dans les prélèvements. Ce sont presque toujours des contaminants qu'il importe de distinguer des staphylocoques.

■ **Le genre *Staphylocococcus***

Il comprend de nombreuses espèces : certaines sont des hôtes de l'homme, d'autres des animaux, d'autres sont rencontrés à la fois chez l'homme et l'animal.

Chez l'homme les espèces les plus couramment rencontrées sont :

- *Staphylococcus aureus*, le plus pathogène ;

- *Staphylococcus epidermidis*, souvent considéré comme un opportuniste ;

- *Satphylococcus saprophyticus* responsable d'infections urinaires chez la femme jeune ;

- et à une fréquence moindre *Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus hominis, Staphylococcus capitis et Staphylococcus auricularis*.

Staphylococcus aureus exprime des caractères qui le différencient des autres staphylocoques : il possède notamment une coagulase. En pratique bactériologique courante, ce caractère permet de faire la distinction entre *Staphylococcus aureus* d'une part et les staphylocoques à coagulase négative d'autre part.

■ **Le genre *Stomatococcus***

Il comprend *Stomatococcus mucilaginosus* qui fait partie de la flore buccale.

■ **Le genre *Planococcus***

Il comprend des bactéries du milieu marin.

I.3. – CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

I.3.1. – Caractères morphologiques [24, 38, 55]

Les staphylocoques se présentent à l'examen microscopique sous l'aspect de coques à Gram positif isolés ou groupés en diplocoques ou en amas. Le mode de groupement dit en « grappe » ou en « amas » est plus caractéristique après culture sur un milieu gelosé.

Sur le plan individuel, ce sont des cocci qui mesurent 0,8 à 1 µm de diamètre, immobiles, asporulés, généralement acapsulés ou ayant une faible capacité de synthèse de capsule.

I.3.2. – Caractères culturaux [12, 24, 42, 55]

Les staphylocoques se développent en aérobiose ou en anaérobiose sur la plupart des milieux usuels.

Certaines souches nécessitent cependant une forte pression en CO_2 pour une croissance optimale ainsi que la présence d'autres métabolites tels que l'hémine ou la ménadione. La température optimale de croissance est de +30°C à +45°C avec un maximum à 37°C et le pH varie entre 4,8 à 9,4 avec un optimum à 7,5.

En bouillon, les staphylocoques se multiplient en quelques heures formant un trouble homogène.

Sur gélose ordinaire, les colonies sont lisses, rondes, opaques, plus ou moins bombées avec un diamètre variant de 1,5 à 4 mm. La plupart des souches produisent un pigment jaune doré, parfois jaune citrin.

En milieu gélosé au sang, on observe fréquemment une zone claire d'hémolyse (β hémolyse) autour des colonies.

La plupart des souches de staphylocoques pousse sur un milieu synthétique contenant entre autres du glucose, des sels minéraux, acides aminés dont la cystéine, la vitamine B_1 et l'acide nicotinique.

I.3.3. – Caractères biochimiques et métaboliques

L'étude des différents caractères biochimiques et métaboliques des staphylocoques a permis le développement de galeries d'identification rapides et efficaces, permettant de définir les différents profils biochimiques des souches appartenant à une même espèce.

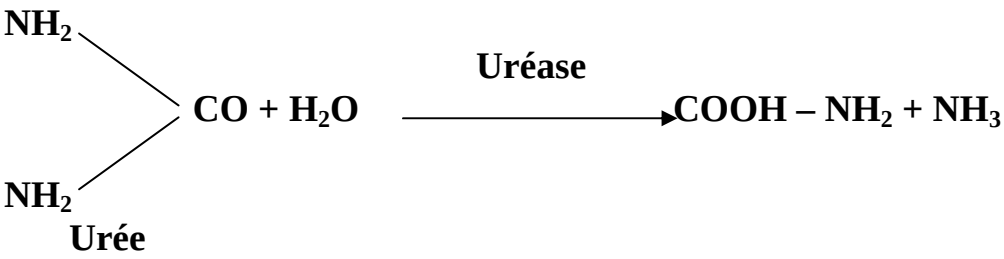
I.3.3.1. – Caractères généraux [24, 37, 55]

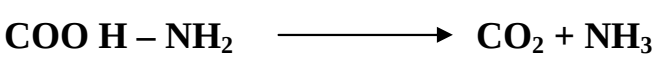
Les staphylocoques possèdent une catalase à l'exception de *Staphylococcus aureus* sous espèces *anaerobius* que l'on retrouve exclusivement chez les moutons et qui est une souche anaérobie stricte. Ce sont des germes dépourvus d'oxydase en dehors de *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri* et *Staphylococcus caseolyticus*.

I.3.3.2. – Production d'uréase [38]

Les bactéries hydrolysent toute l'urée mais seules celles ayant une uréase constitutive, c'est-à-dire dont la synthèse est indépendante de la présence du substrat, vont arriver à alcaliniser le milieu, entraînant le virage de l'indicateur coloré.

L'uréase est également une enzyme inductible. La recherche de l'uréase repose sur la libération d'ions ammonium qui alcalinisent le milieu, entraînant le virage de l'indicateur coloré au rose framboise selon la réaction suivante :

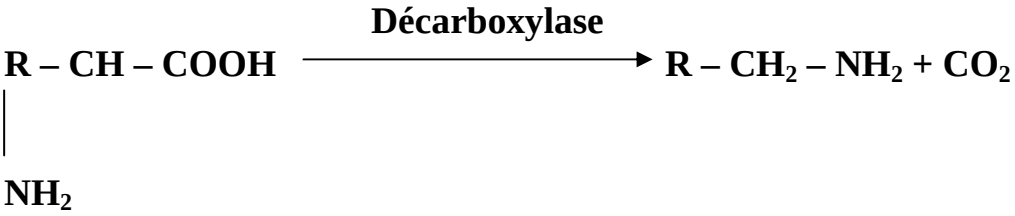




I.*3.3.3.* – *Production de décarboxylases* [38]

Les décarboxylases sont des enzymes qui sont actives à pH acide ; le milieu d'étude sera donc acidifié par la fermentation du glucose puis alcalinisé par l'action des décarboxylases sur le substrat qui est un acide aminé.

Les décarboxylases scindent les acides aminés avec formation de l'amine correspondante et libération de dioxyde de carbone selon la réaction suivante :



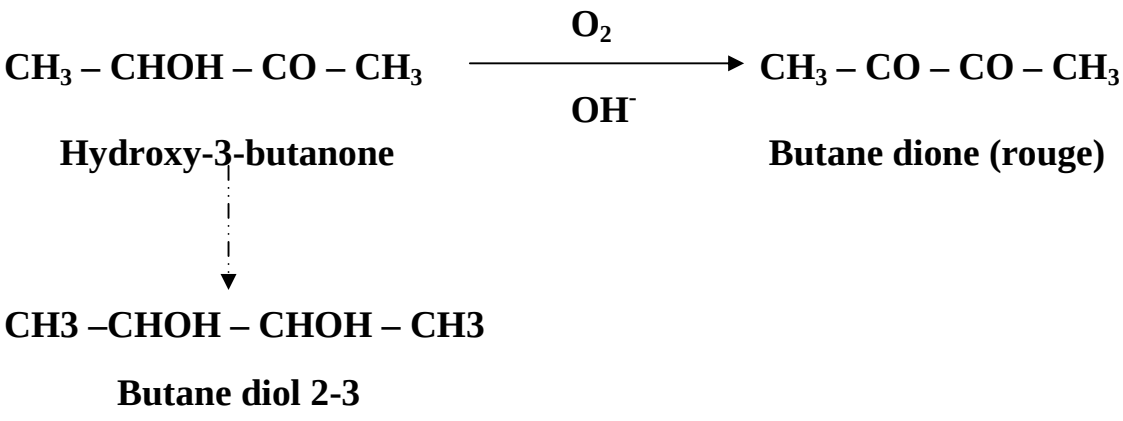
Les enzymes le plus souvent recherchées sont :

- l'ornithine décarboxylase (ODC) ;
- l'arginine dihydrolase (ADH) ;
- la lysine décarboxylase (LDC).

I.3.3.4. – Production d'acétoïne [38]

L'acétoïne en langage courant, ou hydroxy-3-butanone ou encore dans la nomenclature ancienne acetyl-methyl-carbinol (AMC) est un produit de dégradation du glucose au cours de la fermentation du 2-3 butylène glycolique en passant par l'acétolactate et le diacetyl. Elle peut également être obtenue par la condensation de deux molécules de pyruvate.

Il existe entre autres la méthode conventionnelle de Voges Proskauer miniaturisée ou non, incorporée aux méthodes biochimiques d'identification des staphylocoques.



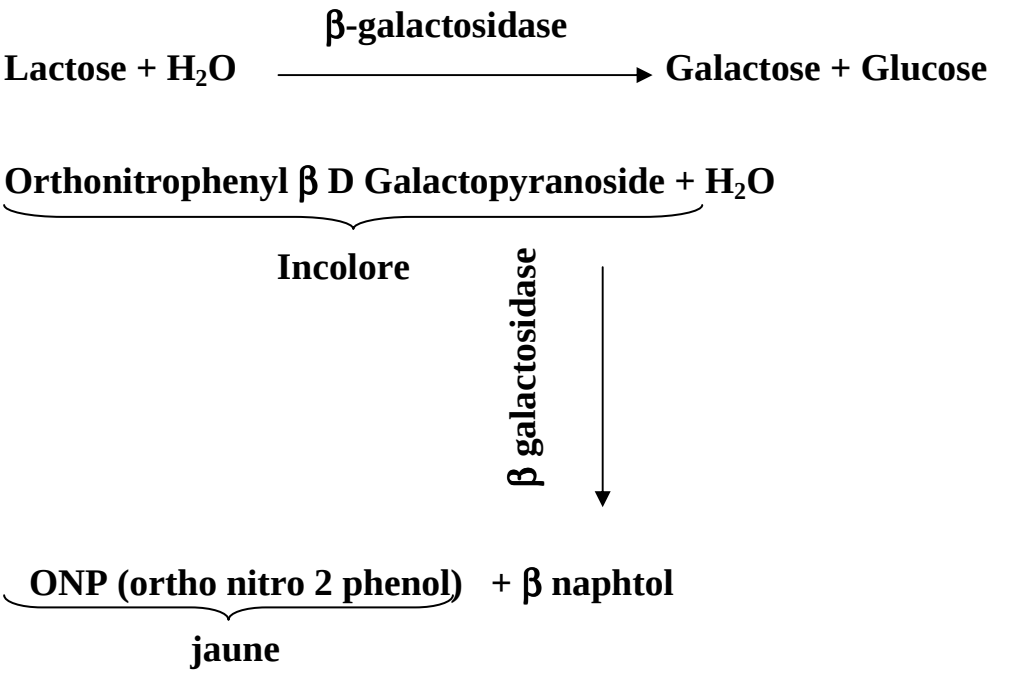
I.3.3.5. - Production de β-galactosidase [38]

La β galactosidase est une enzyme bactérienne inductible existant à un niveau de base dans le milieu intracellulaire, capable de scinder la molécule de lactose en sucres simples que sont le glucose et le galactose après avoir traversé la paroi cellulaire sous l'action de la β galactosidase perméase.

Le terme ONPG hydrolase est plus à propos que celui de β galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose. Le test à l'ONPG est une technique relativement simple basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'ortho-nitrophényl-β-D-galactopyranoside, ou le 2-naphtol β-D-galactopyranoside.

Ceux-ci sont utilisés comme substrats et libèrent respectivement l'orthonitrophenol jaune et le β naphtol qui se combine au sel de Fast blue B en

solution dans le 2-methoxyethanol pour donner une coloration rouge pourpre. Les réactions chimiques mises en jeu peuvent être décrites de la façon suivante :



I.3.3.6. - Réduction des nitrates [54]

Les composés oxygénés de l'azote peuvent être utilisés comme accepteurs terminaux d'électrons dans les chaînes d'oxydo-réduction cellulaires.

La réduction des nitrates et des nitrites constitue un des caractères taxonomiques importants chez les staphylocoques lors de leur identification.

Ce test permet d'étudier la réaction de réduction des nitrates en nitrites sous l'action de la nitrate réductase produite par certains staphylocoques. La réaction sera mise en évidence par l'addition d'acide sulfanilique et d'alpha naphtylamine qui révèlent la présence de l'ammoniaque libéré.

I.3.3.7. - Résistance à la novobiocine [47]

Les staphylocoques à coagulase négative sont habituellement classés selon le critère de sensibilité ou de résistance à la novobiocine.

La novobiocine est un antibiotique bactériostatique peu utilisé en thérapeutique, pouvant s'avérer très actif sur les bactéries à Gram positif, en particulier les

staphylocoques. Son action consiste en l'inhibition de la réplication de l'acide désoxyribonucléique (ADN), ce qui empêche la fixation de l'ATP sur la sous-unité B de l'ADN gyrase, phénomène fournissant l'énergie nécessaire au fonctionnement de cette enzyme.

Ce sont généralement les souches de *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus cohnii cohnii*, *Staphylococcus cohnii urealyticum* et *Staphylococcus xylosus* qui sont résistantes à la novobiocine.

I.3.3.8. - Utilisation des hydrates de carbone [47]

Les glucides sont utilisés de trois manières différentes par les staphylocoques : soit après conversion par l'action d'isomérases, après hydrolyse en sucres simples ou directement s'ils sont fournis sous une forme simple (glucose, fructose).

L'assimilation étudiée surtout par la voie fermentaire mais également par la voie oxydative se traduit presque toujours par l'accumulation de dérivés acides quelque soit la voie de dégradation.

II – LES STREPTOCOQUES NON GROUPABLES

II.1. – DEFINITION

Les streptocoques, bactéries ovoïdes ou sphériques associées en chaînettes, appartiennent à la vaste famille des *Streptococcaceae*, ensemble hétérogène de cocci prenant la coloration de Gram, dépourvues de cytochrome et de catalase. Ils sont immobiles, non sporulés, aéro anaérobies facultatifs.

II.2. – TAXONOMIE

II.2.1. – Historique [15, 16, 60, 62, 66]

En 1877, BILROTH et EHRLICH ont donné le nom de *Streptococcus* à des cocci formant des chaînettes, observés dans les blessures infectées.

Streptococcus salivarius a été décrit depuis le début du siècle (ANDREWES et HORDER 1906). Il doit son appellation au fait qu'il soit retrouvé de façon commune au niveau de la salive.

CLARKE (1924) décrit *Streptococcus mutans*. Il fut très vite reconnu comme agent d'endocardite infectieuse (ABERCOMBRE et SCOTT, 1928). *Streptococcus mutans* est en fait un groupe hétérogène divisé d'abord en quatre espèces : *Streptococcus mutans* (la plus fréquente), *Streptococcus rallus*, *Streptococcus cricetus* et *Streptococcus sobrinus* auxquels sont venus se rajouter deux nouvelles espèces isolées chez le rat (*Streptococcus ferus*) ou le singe (*Streptococcus mucacae*).

GUTHOF (1956) utilise pour la première fois le terme de *Streptococcus milleri* pour distinguer les streptocoques non hémolytiques responsables d'infections buccales.

COLMAN et WILLIAMS (1972) ont proposé de rapprocher *Streptococcus milleri* des streptocoques décrits par MIRICK et coll. (1944) et des streptocoques décrits par OTTENS et WINKLER (1962) en raison de la similitude de leurs caractères physiologiques et de la composition de leur paroi.

En 1977, FACKLAM proposait d'individualiser deux espèces au sein de *Streptococcus milleri* sur la base de la fermentation du lactose : *Streptococcus intermedius* (lactose +) et *Streptococcus anginosus constellatus* (lactose -).

Actuellement le composé *Streptococcus milleri* comporte trois espèces : *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius* et *Streptococcus anginosus*.

II.2.2. – <u>Habitat</u> [28]

Les streptocoques non groupables sont des commensaux de la cavité buccale (dont ils représentent 30 à 60 p. 100 de la flore bactérienne), de l'intestin, de la peau et des voies génitales.

II.2.3. – <u>Classification</u> [15, 21, 31, 59, 61, 62]

La famille des *Streptococcaceae* comprend sept genres. Parmi eux, *Streptococcus* et *Enterococcus* regroupent la plupart des espèces responsables d'infections humaines.

La classification se fonde sur plusieurs critères :

■ *la capacité d'hémolyser les érythrocytes* :

- hémolyse incomplète : Streptocoques α hémolytiques ;

- hémolyse complète : Streptocoques β hémolytiques ;

- pas d'hémolyse : Streptocoques non hémolytiques.

■ *la présence d'antigènes polyosidiques spécifiques* de groupe dans leur paroi cellulaire.

Un antigène de la paroi, le polyoside C permet de définir plusieurs groupes : A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, R, S, T, U, V. Les streptocoques dépourvus de polyoside C sont dits « non groupables ».

■ *les réactions biochimiques spécifiques* :

Les streptocoques non groupables constituent un vaste ensemble d'espèces. Ils comprennent particulièrement le groupe des streptocoques viridans notamment les différents germes bucco-pharyngés commensaux qui peuvent devenir éventuellement pathogènes : *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis* et les six espèces du « groupe » *Streptococcus mutans* englobant *Streptococcus mutans* (serotypes c, e, f), *Streptococcus gucetus* (serotype a), *Streptococcus rattus* (serotype b), *Streptococcus sobrinus* (serotypes d et g) présents chez l'homme, ainsi que *Streptococcus ferus* et *Streptococcus mucacae*.

II.3. – CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

II.3.1. – Caractères morphologiques [44]

Les streptocoques se présentent sous forme de cocci à Gram positif ovoïdes, sphériques ou lancéolés de 0,5 à 1 mm de diamètre non mobiles et non sporulés. Ils se divisent dans un seul plan avec séparation incomplète des cellules filles formant ainsi des paires (diplocoques : *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*) ou le plus souvent des chaînettes de longueur variable se présentant comme une suite de diplocoques liés par du matériel de la paroi cellulaire. Les streptocoques ne possèdent pas de capsule externe autour de la paroi, sauf chez les formes S (smooth) des pneumocoques, irrégulièrement et transitoirement (cultures jeunes) chez certaines souches des groupes A et C.

II.3.2. – Caractères culturaux [1, 3, 4, 10, 42]

La pousse de nombreuses espèces exige des milieux nutritifs enrichis de sang ou de sérum. Les milieux gélosés nutritifs : gélose nutritive ordinaire, gélose trypticase soja, milieu de Müller Hinton, gélose Columbia additionnés de 5 % de sang de cheval ou de mouton conviennent très bien.

La température optimale de croissance est de 35 à 37°C. Les streptocoques non groupables sont des germes très exigeants, qui repoussent difficilement sur les milieux usuels pour streptocoques après leur isolement d'une hémoculture (trouble uniforme du milieu liquide). La mise en évidence de ces souches est possible en milieu de culture thiolés (L cystéine, acide thioglycolique, polyvitex, etc.), de pyridoxine et de D alanine. La croissance est plus riche en anaérobiose ou en présence de 10 % de CO_2.

Habituellement, la croissance de ces germes est révélée par la croissance d'autres souches (staphylocoques, entérobactéries…) sur le milieu gélosé au sang. Ce phénomène de satellitisme est caractérisé par la croissance des streptocoques déficients sous la forme de colonies minutes entourant la culture en touche du germe révélateur.

II.3.3. – Caractères biochimiques [4, 14, 30, 65]

De nombreuses réactions biochimiques ont été décrites pour le diagnostic des streptocoques ; une étude sur 600 souches a démontré que certains tests étaient peu significatifs et surtout qu'ils n'étaient pas constants pour des groupes de souches pourtant bien individualisées du point de vue sérologique.

Cependant, certains tests ont une grande valeur diagnostique et permettent l'individualisation des streptocoques non groupables.

Les principales réactions se résument comme suit :

- fermentation de divers sucres ;
- hydrolyse de l'amidon, de l'arginine, de l'esculine et de la gélatine ;
- croissance sur milieux hostiles (bile-esculine et 6,5 p. 100 de NaCl) ;
- résistance à 60°C et au tellurite de potassium ;
- production d'acétyl méthyl carbinol et formation de glucanes.

Certaines espèces de streptocoques telles que *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* et *Streptococcus salivarius* sont facilement différenciées par la caractérisation de ces polyosides sur des milieux hypersaccharosés.

Le principe du test est basé sur l'hydrolyse du saccharose en ses composants monosaccharidiques (glucose et fructose) par des enzymes spécifiques extracellulaires élaborées par les streptocoques. Certaines souches forment du dextrane à partir du glucose et d'autres du levane à partir du fructose.

Les principaux caractères biochimiques des streptocoques non groupables sont résumés dans le tableau ci-dessous.

I – MATERIEL ET REACTIFS

I.1. – MATERIEL

I.1.1. – Cadre d'étude

Ce travail a été effectué à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie microbienne du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec.

I.1.2. – Souches bactériennes

Nous avons utilisé des souches de staphylocoques et de streptocoques.

I.1.3. – Matériel pour la préparation des milieux

- Balance de précision
- Agitateur magnétique
- pH mètre
- Seringues
- Filtres millipores
- Micropipettes de 100 et 200 µl
- Embouts stériles
- Flacons en verre
- Tubes stériles à bouchon
- Erlen meyer
- Bain marie
- Autoclave

I.1.4. – Matériel pour l'enrichissement et l'isolement

- Tube nunc
- Anse de platine
- Boîtes de Pétri
- Bec bunsen
- Etuve

- Autoclave
- Jarre d'incubation
- Générateur de CO_2 ou bougie

I.1.5. – Matériel pour l'identification

I.1.5.1. – Matériel de laboratoire

- Bec bunsen
- Etuve
- Four à micro-ondes
- Agitateur magnétique
- Appareil de scellage
- Dessiccateur sous vide à air renouvelé
- Microscope optique

I.1.5.2. – Matériel de paillasse

- Micropipettes
- Microplaques
- Embouts stériles
- Becher rempli d'eau de javel
- Plateau (inoxydable de préférence)
- Papier buvard
- Etalon de Mac Farland
- Anse de platine
- Emballage plastique
- Lame porte-objet
- Lamelles

I.1.6. – Matériel pour la conservation

- Tubes nunc
- Tubes stériles à vis
- Cryotubes avec billes
- Portoirs
- Anse de platine

I.2. – REACTIFS

I.2.1. – Réactifs pour l'enrichissement et l'isolement

- Bouillon glucosé tamponné
- Gélose Müller Hinton (MH)
- Gélose trypticase soja
- Sang de mouton
- Gélose chapman
- Chlorhydrate de pyridoxal
- L cystéine

I.2.2. – Réactifs pour l'identification

I.2.2.1. – Substrats pour l'identification

- Eau oxygénée
- Disques oxydase
- Violet de gentiane
- Lugol
- Alcool à 95°C
- Fuchsine de Ziehl
- Plasma de lapin
- Gélose à l'ADN
- Bile esculine
- Bouillon hypersalé
- Milieu urée-tryptophane

- Milieu de Clark et Lubs
- Milieu à l'ONPG
- Eau distillée
- Milieu pour la recherche de la nitrate réductase
- Esculine
- Milieu de Falkow
- L ornithine
- L arginine
- Bouillon rouge de phénol
- Glucides : glucose, mannitol, xylose, saccharose, glycérol, mannose, lactose, raffinose, L arabinose, sorbitol, Tréhalose, sorbose, inuline, lactose, ribose, amidon.
- Huile de paraffine.

I.2.2.2. – Réactifs de révélation

- Acide sulfanilique à 8 g/l
- α-naphtylamine à 5 g/l
- Potasse à 10 %
- Créatinine à 1 %
- α-naphtol

I.2.3. – <u>Réactifs pour la conservation des souches</u>

- Bouillon cœur-cervelle + 10 % de glycérol + sérum de veau fœtal
- Lait écrémé
- Gélose Müller Hinton
- Billes

II – PREPARATION DES DIFFERENTS MILIEUX

II.1. – MILIEUX POUR L'ENRICHISSEMENT ET L'ISOLEMENT

■ Bouillon glucosé tamponné

C'est un milieu de régénération des souches conservées à -20°C et -70°C.

● Formule

Réactifs	**Quantité**
Bouillon glucosé tamponné	19 g
Eau distillée	500 ml

- Répartir dans les tubes à vis et autoclaver à 115°C pendant 20 minutes ; ajuster le pH à 7,4.

● Gélose au sang + chlorhydrate de pyridoxal

C'est un milieu d'isolement des streptocoques non groupables.

*** Milieu de base**

Réactifs	**Quantité**
Gélose Agar	8,5 g
Trypticase Soja	15 g
Eau distillée	500 ml

Autoclaver le mélange pendant 15 minutes à 121° C. Laisser refroidir.

*** Milieu complet**

Réactifs	**Quantité**
Milieu de base	500 ml
Sang de mouton	25 ml
Chlorhydrate de pyridoxal	0,05 g

Homogénéiser le mélange et le répartir dans des boîtes de pétri.

● **Gélose au sang ordinaire**

C’est le milieu utilisé pour isoler les staphylocoques. Il permet d’obtenir des colonies de taille plus importante.

*** Milieu de base**

Réactifs	**Quantité**
Gélose Agar	8,5 g
Trypticase Soja	15 g
Eau distillée	500 ml

Autoclaver le mélange à 121°C pendant 15 minutes. Laisser refroidir.

*** Milieu complet**

Réactifs	**Quantité**
Milieu de base	500 ml
Sang de mouton	25 ml

Le sang est ajouté après refroidissement du milieu de base. Le mélange est homogénéisé puis réparti dans des boîtes de pétri.

II.2. – MILIEUX POUR L’IDENTIFICATION

■ **Milieu Chapman**

C’est le milieu qui permet la recherche de la fermentation du mannitol par les staphylocoques. C’est une poudre prête à l’emploi. Verser 55,5 g de poudre dans 500 ml d’eau distillée.

● **Formule**

Réactifs	**Quantité**
Chapman	55,5 g
Eau distillée	500 ml

Porter le mélange à ébullition jusqu'à dissolution complète. Ajuster à pH 7,5 ± 0,2 et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

■ Milieu pour la recherche de la DNase

C'est un milieu prêt à l'emploi. Régénérer le flacon au bain-marie et le répartir dans des boîtes de pétri.

■Milieu Bile esculine

● **Formule**

Réactifs	**Quantité**
Extrait de levure	3 g
Peptone	5 g
Bile	40 g
Esculine	1 g
Citrate de fer	0,5 g
Agar agar	15 g
Eau distillée	100 ml
Ajuster à pH 6,6 ± 0,2	

Porter le mélange à ébullition jusqu'à dissolution complète, le répartir dans des tubes à vis. Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

■Bouillon hypersalé

● **Formule**

Réactifs	**Quantité**
Bouillon MH	5 g
NaCl	13 g
Glucose	0,2 g
Bromocrésol pourpre (1,6 %)	200 µl
Eau distillée	100 ml

Ajuster le pH à 7-7,2 et autoclaver à 121°C pendant 20 minutes.

■ **Milieu urée tryptophane**

Il permet la recherche de l'uréase.

● **Formule**

Réactifs	**Quantité**
L tryptophane	0,6 g
Phosphate monopotassique	0,2 g
Phosphate dipotassique	0,2 g
NaCl	1 g
Eau distillée	100 ml

Stériliser par filtration.

■ **Milieu de Falkow**

C'est le milieu de base pour la recherche des décarboxylases. Il est commercialisé sous forme déshydratée.

● **Formule**

Réactifs	**Quantité**
Extrait de levure	0,6 g
Glucose	0,2 g
NaCl	1 g
Rouge de Phénol	0,03 g
Acide aminé (L ornithine ou L arginine)	1 g
Eau distillée	100 ml

Le milieu ainsi préparé doit être autoclavé à 120°C pendant 15 minutes et son pH ajusté à 6,3-6,4.

■Milieu de Clark et Lubs (réaction de Voges Proskauer)

● **Formule**

Réactifs	**Quantité**
Polypeptone ou peptone sans NaCl	0,7 g
Glucose	0,5 g
Phosphate dipotassique	0,5 g
Eau distillée	100 ml

Ajuster à pH 6,9 et autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

■ Milieu à l'ONPG

Il concourt à la caractérisation de la β-galactosidase.

Dix disques d'ONPG ont été immergés dans 5 ml d'eau distillée, puis le milieu obtenu a été homogénéisé pour favoriser l'élution des disques.

■ Milieu pour la recherche de la nitrate réductase

Il s'agit d'un bouillon nutritif nitraté :

● **Formule**

Réactifs	**Quantité**
Peptone	0,5 g
Extrait de viande	0,3 g
Eau distillée	100 ml

Ajuster à pH 7 et ajouter 2 g de nitrate de sodium, dissoudre et autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

NB : *Avec du bouillon nutritif déshydraté, il suffit de dissoudre 1,6 g de milieu sec dans 100 ml d'eau distillée pour préparer le bouillon.*

■ **Milieu pour la mise en évidence de l'attaque de l'esculine.**

● **Formule**

Réactifs	**Quantité**
Peptone	20 g/l
Citrate de fer ammoniacal	2 g/l
Glucose	2 g/l

Ajuster le mélange à pH 7,4. Stériliser à 110°C pendant 30 minutes.

■ **Préparation des sucres**

Glucides		**Stérilisation**	**Température et durée**	
Arabinose	10 %	Tyndalisation ou filtration	60°C	30 minutes x 3 jours
Mannitol	10 %	Autoclavage	110°C	10 minutes
Sorbitol	10 %	Autoclavage	110°C	10 minutes
Tréhalose	10 %	Autoclavage	110°C	10 minutes
Raffinose	10 %	Autoclavage	110°C	10 minutes
Sorbose	10 %	Autoclavage	110°C	10 minutes
Inuline	5 %	Autoclavage	110°C	10 minutes
Lactose	10 %	Tyndalisation ou filtration	60°C	30 minutes x 3 jours
Amidon	2,5 %	Autoclavage	115°C	30 minutes
Glycérol	10 %	Autoclavage	115°C	30 minutes
Glucose	10 %	Autoclavage	110°C	10 minutes
Xylose	10 %	Filtration		
Saccharose	10 %	Tyndalisation ou filtration	60° C	30 minutes x 3 jours
Mannose	10 %	Autoclavage	110°C	10 minutes

■ **MEVAG Strepto/Staph**

Il s'agit d'une base de culture au rouge de phénol, commercialisée sous forme de poudre déshydratée.

● **Formule approximative par litre**

Réactifs	**Quantité**
Extrait pancréatique de caséine	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Rouge de phénol	0,018 g

● **Mode d'emploi**

Suspendre 15 g de poudre dans un litre d'eau distillée, autoclaver le mélange à 118°C pendant 15 minutes.

II.3. - REACTIFS DE REVELATION

● **Potasse à 10 % (VP1)**

Potasse	10 g
Eau distillée	100 ml

● **Créatinine à 1 % (VP2)**

Créatinine	1 g
Eau distillée	100 ml

● **α-naphtol (VP3)**

Naphtol	1 g
Ethanol 70°C	100 ml

● **Acide sulfanilique**

Acide sulfanilique	0,8 g
Ethanol 95°C	100 ml

● **α-naphtylamine**

- α-naphtylamine	0,5 g
- Ethanol	100 ml

III – CONTROLE DE QUALITE DES MILIEUX LIQUIDES

Chaque lot de milieu préparé est soumis à un contrôle de stérilité et un contrôle d'efficacité sur le plan bactériologique.

III.1. – CONTROLE DE STERILITE

Un millilitre de chaque milieu préparé est déposé dans des tubes à hémolyse stériles qui sont incubées à 37°C à l'étude pendant 24 à 48 heures.

Les milieux sont considérés comme stériles en l'absence de trouble et virage de l'indicateur coloré.

III.2. – CONTROLE D 'EFFICACITE

Il est réalisé avec des souches de référence et de contrôle dont le profil biochimique est stable et bien connu.

Ainsi le milieu considéré comme stérile doit faire l'objet d'une étude en ce qui concerne sa capacité à donner un résultat positif ou négatif pour un caractère donné.

■ Technique

Deux plaques sont prévues pour chaque galerie (contrôles positifs et négatifs).

100 µl de chaque milieu sont déposés dans le puits correspondant au niveau de la plaque de façon extemporanée.

Une suspension bactérienne est préparée à partir d'une culture de 24 heures sur milieu solide.

La turbidité de la suspension bactérienne est ajustée à :

- 1 à l'échelle Mac Farland pour les staphylocoques

- 4 à l'échelle Mac Farland pour les streptocoques.

100 µl de chaque suspension bactérienne sont déposés dans les puits correspondants de la plaque et ceci pour chaque galerie.

Pour les cupules contenant les sucres, la suspension bactérienne est mélangée avec le MEVAG Strepto/Staph puis nous avons ensemencé les cupules avec le MEVAG ainsi inoculé (100 µl).

Les cupules LDC, ODC, ADH, URE et tous les sucres sont fermés avec une goutte d'huile de paraffine.

Les plaques sont ensuite déposées sur un plateau recouvert d'un papier buvard imbibé d'eau puis incubées à 37°C à l'étuve pendant 18 - 24 heures.

<u>Tableau II</u> : Plan des plaques pour le contrôle des staphylocoques

<u>Tableau IIa</u> : Plaque des contrôles positifs

URE *S. aureus*	ADH *S. aureus*	ODC *Proteus mirabilis*	VP *S. aureus*	ONPG *S. xylosus*
NIT *S. aureus*	GLU *S. aureus*	TRE *S. xylosus*	MAN *S. aureus*	XYL *S. xylosus*
SAC *S. aureus*	GLY *S. aureus*	MNE *S. xylosus*	LAC *S. aureus*	RAF *Klebsiella pneumoniae*

<u>Tableau IIb</u> : Plaque des contrôles négatifs

URE *S. cohnii*	ADH *S. xylosus*	ODC *S. aureus*	VP *S. cohnii*	ONPG *S. aureus*
NIT *S. cohnii*	GLU *Micrococcus sp*	TRE *S. capitis*	MAN *S.haemolyticus*	XYL *S. aureus*
SAC *S. cohnii*	GLY *Micrococcus sp*	MNE *S. haemolyticus*	LAC *S. cohnii*	RAF *S. aureus*

<u>Tableau III</u> : Plan des plaques pour le contrôle des streptocoques

<u>Tableau IIIa</u> : Plaque des contrôles positifs

VP *Enterecoccus faecalis*	ESC *Enterococcus faecalis*	ADH *Streptococcus pyogenes*	BHS *Enterococcus faecalis*	ARA *Enterococcus avium*
MAN *Enterococcus faecalis*	SOR *Enterococcus faecalis*	TRE *Enterococcus faecalis*	RAF *Klebsiella pneumoniae*	SOS *Enterococcus faecalis*
INU *Streptococcus pneumoniae*	LAC *Streptococcus pneumoniae*	RIB *Enterococcus faecalis*	AMD *Enterococcus faecalis*	GLY *Enterococcus faecalis*

<u>Tableau IIIb</u> : Plaque des contrôles négatifs

VP *Streptococcus pneumoniae*	ESC *Streptococcus agalatiae*	ADH *Enterococcus avium*	BHS *Streptococcus pyogenes*	ARA *Streptococcus pyogenes*
MAN *Micrococcus sp*	SOR *Streptococcus pyogenes*	TRE *Micrococcus sp*	RAF *Streptococcus pyogenes*	SOS *Enterococcus avium*
INU *Enterococcus faecalis*	LAC *Enterococcus faecalis*	RIB *Streptococcus pyogenes*	AMD *Enterococcus avium*	GLY *Enterococcus avium*

IV – DESHYDRATATION DES MILIEUX

La distribution de milieux se fait dans les mêmes plaques que celles utilisées pour le contrôle d'efficacité des milieux liquides.

100 µl de milieu sont distribués dans chaque puit. La déshydratation se fait en présence d'un dessiccateur dans un four à micro-ondes.

Dans ces conditions, les substrats sont déshydratés soit à 37°C pendant 48 heures, soit à 40°C pendant 14 heures, soit à 42°C pendant 15 heures.

■ Contrôle de qualité des milieux déshydratés

● Contrôle de stérilité

Après 24 à 48 heures d'incubation et après révélation de certains tests, le lot est considéré comme stérile en l'absence de virage de l'indicateur et en l'absence de réaction positive pour les tests révélés.

● Contrôle d'efficacité

Nous avons eu recours à la même technique que celle utilisée pour les milieux liquides. La différence est que les cupules renferment des milieux déshydratés.

V – METHODOLOGIE

Il s'agissait de suivre les différentes procédures décrites dans les algorithmes ci-après :

V.1. – SOUCHES ETUDIEES

L'évaluation a porté sur des souches déjà identifiées par les méthodes conventionnelles. La répartition des souches bactériennes par genre et par espèce est donnée dans le tableau IV.

Tableau IV : Répartition des souches bactériennes

Genre	Espèces	Nombre
Staphylococcus	*Staphylococcus cohnii*	6
	Staphylococcus xylosus	5
	Staphylococcus haemolyticus	1
	Staphylococcus capitis	3
	Staphylococcus warneri	3
Streptococcus	*Streptococcus pneumoniae*	2
	Streptococcus sanguis	3
	Streptococcus milleri	2
	Streptococcus mitis	2
Total		**27**

V.2. – IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE

V.2.1. – Isolement

En vue d'obtenir les colonies des germes à identifier, les souches conservées à -20°C ou -70°C ont été régénérées dans un bouillon glucosé tamponné, puis ensemencées sur une gélose au sang ordinaire incubée à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

V.2.2. – Identification

V.2.2.1. – Examen macroscopique

Les staphylocoques donnent, sur gélose au sang de mouton, des colonies opaques, lisses, jaunes ou blanches, entourées d'une zone d'hémolyse.

V.2.2.2. – Examen microscopique

A partir d'une colonie, nous avons confectionné un frottis que nous avons ensuite coloré au Gram.

L'examen microscopique à l'objectif à immersion montre des diplocoques Gram positif disposés en amas ou en grappes de raisin.

V.2.2.3. – Test à la catalase

- **Principe**

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau plus oxygène.

- **Technique**

Ce test consiste à réaliser un frottis à partir de colonies isolées sur un milieu exempt de sang comme la gélose trypticase-soja. Nous y avons déposé quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène à 3 % et recherché immédiatement une libération d'oxygène.

- **Lecture**

Catalase positive : apparition de bulles d'oxygène

Catalase négative : l'aspect reste inchangé.

- **Résultats**

Les staphylocoques sont catalase positive à l'exception de *Staphylococcus saccharolyticus* et *Staphylococcus aureus anaerobius* qui sont catalase négative.

V.2.2.4. – Type respiratoire

L’identification bactérienne va chercher à caractériser le type respiratoire de la bactérie en fonction de l’apport en oxygène.

- **Technique**

Nous avons eu recours à la gélose viande-foie à 6 % d’Agar conditionnée en tube veillon. Le milieu est régénéré pendant 30 minutes au bain-marie puis refroidit à 40-45°C et enfin ensemencé en spirale. L’incubation se fait à l’étuve à 37°C pendant 24 heures.

- **Résultats**

Les staphylocoques se sont développés tout au long du tube. Ils sont donc des bactéries aéro-anaérobies facultatives.

V.2.2.5. – Réaction à l’oxydase

- **Principe**

Cette réaction est recherchée sur des cultures en milieu gélosé exempt de sucre ou de sang. Les bactéries possédant des oxydases en présence de sucre donnent des métabolites qui se combinent avec les réactifs utilisés pour donner une coloration variable selon la bactérie.

- **Technique**

Elle consiste à placer un disque OX sur une lame porte-objet et à l’imbiber avec une goutte d’eau.

Prélever à la pipette boutonnée une parcelle de culture et la poser sur le disque.

- **Lecture**

Une réaction positive se traduit par une coloration violette.

Une absence de coloration signe un test négatif.

● **Résultats**

Les staphylocoques sont oxydase négative à l'exception de *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri* et *Staphylococcus vutulus* qui sont oxydase positive.

NB : *pour prélever les colonies à tester, il ne faut pas utiliser des fils métalliques chargés d'oxydes qui pourraient être responsables d'un résultat faussement positif.*

V.2.2.6. – Test à la coagulase

● **Principe**

La coagulase est une enzyme d'origine chromosomique.

Ce test met en évidence la coagulase libérée dans le milieu de culture.

● **Technique**

Ce test consiste à mettre dans un tube à essai 0,5 ml de suspension bactérienne et 0,5 ml de plasma de lapin et l'incubation se fait à l'étuve pendant 3 à 24 heures.

● **Lecture**

Une réaction positive se traduit par une coagulation du plasma de lapin au bout de 3 heures.

Réaction négative : l'aspect reste inchangé.

● **Résultats**

Les staphylocoques sont coagulase négative à l'exception de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus schleiferi* et certaines souches de *Staphylococcus hyicus*.

V.2.2.7. – Test à la DNase

● **Principe**

Certaines bactéries sont capables de dégrader l'ADN inclus dans le milieu de culture.

● **Technique**

Ce test consiste à ensemencer les colonies suspectes sous forme de strie dans la gélose à l'ADN et à incuber à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Après culture, le milieu est inondé d'acide chlorhydrique normal.

● **Lecture**

L'apparition d'une zone claire autour de la strie d'ensemencement indique une réaction positive.

L'absence d'une zone claire traduit une réaction négative.

● **Résultats**

Les staphylocoques sont Dnase négative, à l'exception de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus hyicus* et certaines souches de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*.

V.2.2.8. – Recherche de la fermentation du mannitol

● **Principe**

Certaines bactéries sont capables de fermenter le mannitol inclus dans le milieu de culture.

● **Technique**

Elle consiste à ensemencer les colonies dans la gélose chapman et à incuber à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

● **Lecture**

Réaction positive : coloration jaune du milieu.

Réaction négative : l'aspect reste inchangé.

V.2.2.9. –Microméthode d'identification

Nous avons eu recours aux microplaques CSB staph.

● Principe

Les galeries CSB staph permettent la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation de substrats carbonés en milieu approprié (fermentation) ou hostile. Avec 15 tests biochimiques, il permet de faire un diagnostic d'espèces de staphylocoques.

● Technique

La suspension bactérienne est préparée en délayant des colonies bien isolées de 24 heures dans 1 ml d'eau physiologique par écouvillonnage.

La turbidité de la suspension bactérienne est ajustée à l'échelle 1 de l'étalon Mac Farland. Il faut :

- distribuer 100µl d'inoculum bactérien par microcupule de URE à NIT.

- verser le reste de la suspension bactérienne dans 1 ml de MEVAG et mélanger.

- ensemencer les cupules de GLU à RAF avec 100 µl de MEVAG ainsi inoculé.

- recouvrir les puits URE, ADH, ODC et tous les sucres avec 2 gouttes d'huile de paraffine afin de maintenir l'anaérobiose nécessaire aux réactions.

- incuber à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau.

- lire après 4 heures, puis après 18 heures d'incubation.

● Lecture et interprétation

La lecture repose sur le changement de la coloration initiale des différents milieux. Pour la plupart des milieux, la lecture s'est faite directement ; par contre, pour d'autres, elle a nécessité l'addition de réactifs.

La lecture des caractères est faite sur une fiche de lecture (cf. tableau V).

Tableau V : Lecture des staphylocoques

Tests	Substrats	Réactions / Enzymes	Réactifs à ajouter	Résultats positifs	Résultats négatifs
URE	Urée	Uréase		Rose framboise	Orange
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase		Rouge	Jaune
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase		Rose-rouge	Jaune
VP	Glucose + Pyruvate	Production d'acétoïne	1 goutte de KOH 1 goutte de α-naphtol	Rose-rouge	Incolore
ONPG	ONPG	β-galactosidase		Rouge	Incolore
NIT	Nitrate de potassium	Nitrate réductase	1 goutte d'acide sulfanilique 1 goutte α-naphtylamine	Rouge	Incolore
GLU TRE MAN XYL SAC GLY MNE LAC RAF	Glucose Tréhalose Mannitol Xylose Saccharose Glycérol Mannose Lactose Raffinose	Fermentation		Jaune	Rouge

L'identification est rendue possible grâce à l'utilisation de tableau d'identification (cf. tableau VI).

V.3. – IDENTIFICATION DES STREPTOCOQUES NON GROUPABLES

V.3.1. – Isolement

En vue d'obtenir les colonies des germes à identifier, les souches conservées à -20°C ou -70°C ont été régénérées dans un bouillon glucosé tamponné, puis ensemencées sur une gélose au chlorhydrate de pyridoxal incubée à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

V.3.2. – Identification

V.3.2.1. – Examen macroscopique

Les streptocoques non groupables se présentent sous forme de petites colonies translucides α ou non hémolytiques. En particulier, le pneumocoque donne de petites colonies mucoïdes ou à dépression centrale avec une hémolyse α viridans.

V.3.2.2. – Examen microscopique

A partir d'une colonie, nous avons confectionné un frottis que nous avons coloré au Gram.

L'observation microscopique à l'objectif à immersion des streptocoques non groupables montre des cocci Gram positif groupés en chaînettes. Cependant, le pneumocoque se présente sous forme de diplocoques Gram positif en flamme de bougie.

V.3.2.3. – Test à la catalase **(cf. V.2.2.4)**

Les streptocoques sont catalase négative.

V.3.2.4. – Type respiratoire **(cf. V.2.2.3)**

Les streptocoques non groupables sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives.

V.3.2.5. – Bile esculine

● Principe

Ce milieu est destiné à l'isolement sélectif et à la différenciation des streptocoques D pour lesquels la tolérance à la bile et l'hydrolyse de l'esculine sont considérées comme des caractères constants.

● Technique

La colonie prélevée avec soin est ensemencée dans la gélose bile esculine par piqûre centrale, puis incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

● Lecture

Les streptocoques du groupe D et les entérocoques sont bile esculine positifs.

Les autres streptocoques sont bile esculine négatifs. Cependant, des souches bile esculine positive peuvent s'observer avec *Streptocococcus mutans*.

V.3.2.6. – Bouillon hypersalé

● Principe

C'est un bouillon qui permet de différencier les entérocoques des non entérocoques.

● Technique

Les colonies prélevées avec soin sur la gélose sont délayées dans le bouillon hypersalé ; puis incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

● Lecture

Les entérocoques vrais se développent en 24-48 heures. Les non entérocoques sont incapables de pousser.

● Résultats

Les streptocoques non groupables sont BHS.

V.3.2.7. – Test de sensibilité à l'optochine

● Principe

Les colonies de *Streptococcus pneumoniae* sont généralement sensibles à l'optochine alors que les autres streptocoques non groupables sont résistants à l'optochine.

● Technique

Une boîte de gélose au sang est inoculée avec une culture pure présumée de *Streptococcus pneumoniae.*

A la surface du premier et du second quadrant de la gélose, nous avons déposé un disque d'optochine et incubé la boîte en atmosphère enrichie en CO_2 pendant 18 heures environ.

Nous avons ensuite recherché la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition autour du disque d'optochine.

● Lecture

Une zone d'inhibition supérieure ou égale à 14 mm de diamètre oriente vers *Streptococcus pneumoniae*.

Une absence d'inhibition oriente généralement vers les streptocoques non groupables α-viridans autre que *Streptococcus pneumoniae.*

V.3.2.8. – Test de solubilité dans la bile

● Principe

Ce test repose sur la mise en évidence de la lyse d'une colonie de streptocoques en 30 minutes, en présence d'une solution de 10 % de désoxycholate de sodium.

● Résultats

Nous avons utilisé la méthode en boîte de pétri.

Sur une colonie α-hémolytique caractéristique, nous avons déposé une ou deux gouttes d'une solution de désoxycholate de sodium à 10 %.

La boîte de pétri est incubée à l'étuve à 35°C pendant deux heures, couvercle vers le haut légèrement entrouvert pour accélérer l'évaporation du réactif.

● **Lecture**

Si l'hémolyse α-*viridans* demeure et que la colonie disparaît, il s'agit de *Streptococcus pneumoniae*.

V.3.2.9. - Microméthode d'identification

Nous avons eu recours aux microplaques CSB strepto.

● **Principe**

C'est une microméthode d'identification. Elle consiste à ensemencer des plaques présentant des cupules qui renferment des substrats déshydratés destinés à la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation de substrats carbonés en milieu appropriée ou hostile.

● **Mode opératoire**

- Préparer une suspension bactérienne de turbidité égale à celle de l'échelle 4 Mac Farland dans 1 ml d'eau distillée stérile avec une boîte entière de culture de 24 heures sur gélose au sang.

- Distribuer 100 µl d'inoculum bactérien par cupule, de VP à BHS.

- Verser le reste de la suspension bactérienne dans 1 ml de MEVAG streptocoque et mélanger.

- Ensemencer les cupules de ARA à GLY avec le MEVAG ainsi inoculé (100 µl par cupule).

- Fermer les cupules ADH et tous les sucres avec 2 gouttes d'huile de paraffine.

- Incuber à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau.

- Lire après 4 heures puis après 18 heures d'incubation.

- La lecture et l'identification sont rendues possibles grâce au tableau suivant.

<u>Tableau VII</u> : Lecture des streptocoques

Tests	Substrats	Réactions Enzymes	Réactifs à ajouter	Résultats positifs	Résultats négatifs
VP	Glucose + Pyruvate	Production d'acétoïne	1 goutte de KOH 1 goutte de créatinine 1 goutte de α-naphtol	Rose-rouge	Incolore
ESC	Esculine	β-glucosidase		Noir	Incolore
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase		Rouge	Jaune
BHS	Glucose	Croissance en milieu hypersalé		Jaune	Violet
ARA MAN SOR TRE RAF SOS INU LAC RIB AMD GLY	L Arabinose Mannitol Sorbitol Tréhalose Raffinose Sorbose Inuline Lactose Ribose Amidon Glycérol	Fermentation		Jaune	Rouge

I – MISE AU POINT DES ALGORITHMES

Seuls les caractères majeurs, c'est-à-dire ceux supposés indispensables pour l'identification d'une espèce, ont été retenus dans nos algorithmes. Ces caractères peuvent différer d'une espèce à une autre.

I.1. – LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE

Les caractères suivants ont été retenus :

- Gram ;

- type respiratoire ;

- recherche de la catalase, de l'oxydase, de la coagulase, de la DNase, de la fermentation du mannitol et du glucose ;

- synthèse d'uréase, d'ADH, de β-galactosidase ;

- sensibilité à la novobiocine ;

- dégradation du glucose en acétoïne ;

- assimilation du tréhalose, du xylose, du saccharose, du mannose et du lactose.

I.2. – LES STREPTOCOQUES NON GROUPABLES

Les caractères suivants ont été retenus :

- Gram ;

- type respiratoire ;

- recherche de la catalase ;

- croissance sur bile esculine et sur milieu hypersalé ;

- type d'hémolyse ;

- lyse par la bile, la sensibilité à l'optochine ;

- dégradation du glucose en acétoïne ;

- hydrolyse de l'esculine ;

- synthèse d'uréase, d'ADH ;

- assimilation du tréhalose, du raffinose et de l'inuline.

II – VALIDATION DES ALGORITHMES [57]

Après avoir élaboré nos algorithmes et identifié les différentes espèces dont nous disposons, nous avons essayé de valider ces algorithmes.

Cette validation va passer par l'identification de souches supposées inconnues. Cette identification est basée sur la mesure de similitude entre son profil et celui des espèces identifiables à l'aide de données recueillies (tables diagnostiques). Cependant, nous avons utilisé les résultats de la galerie API staph et API strepto comme référence.

Dans les tables diagnostiques (ou matrices de données) est contenue, pour chaque taxon, la probabilité de positivité (f) aux différents tests. Si la réponse de la souche pour un test est positive, on retient la valeur f ; si elle est négative, on retient la valeur 1-f (probabilité de négativité). Le produit des valeurs (probabilité cumulée) donne la fréquence théorique de la souche dans l'espèce ou probabilité absolue.

Cette fréquence théorique est ensuite divisée par la somme des fréquences théoriques pour chaque taxon soumis à la comparaison. Le résultat (*100) donne la probabilité d'appartenance à l'espèce ou probabilité relative.

Probabilité absolue = produit des valeurs obtenues pour chaque espèce.

$$\textbf{Probabilité relative} = \frac{\text{Probabilité absolue}}{\text{Somme des probabilités absolues}} \times 100$$

On considère généralement les seuils suivants :

- > 99,9 % : excellente identification ;

- > 99 % : très bonne identification ;

- > 90 % : bonne identification ;

- > 80 % : identification acceptable ;

- < 80 % : identification inacceptable.

C'est ainsi que nous allons exploiter les résultats de quelques souches identifiées pour essayer de valider nos algorithmes, en raisonnant en terme de probabilité.

II.1. - IDENTIFICATION DE *STAPHYLOCOCCUS WARNERI*

Toutes les souches de *Staphylococcus warneri* étudiées ont donné le même profil.

Tableau IX : Identification de *Staphylococcus warneri*

Espèces / **Caractères**	***Staphylococcus saprophyticus***	***Staphylococcus warneri***	***Staphyloccus simulans***	**X (*Staphylococcus warneri probable*)**
Gram	100 %	100 %	100 %	+
Catalase	100 %	100 %	100 %	+
Oxydase	0 %	0 %	0 %	-
Mannitol	88 %	70 %	73 %	+
Coagulase	0 %	0 %	0 %	-
D Nase	0 %	0 %	4 %	-
UREE	65 %	97 %	84 %	+
ADH	30 %	77 %	97 %	+
LAC	90 %	19 %	95 %	-
VP	79 %	90 %	38 %	+

+ = (f) ; - = (1-f)

Probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *Staphylococcus saprophyticus* : 0,013

- X appartienne à *Staphylococcus warneri* : 0,38

- X appartienne à *Staphylococcus simulans* : 0,01

Probabilité relative pour que :

- X appartienne à *Staphylococcus saprophyticus* : p = 3,22 %
- X appartienne à *Staphylococcus warneri* : p = 94,2 %
- X appartienne à *Staphylococcus simulans* : p = 2,48 %

L'algorithme a permis une bonne identification de *Staphylococcus warneri* car la probabilité relative pour que l'espèce X (identifié comme *warneri* à partir de l'algorithme) soit *warneri* est de 94,2 %.

II.2. – IDENTIFICATION DE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS*

Les cinq (5) souches de *Staphylococcus xylosus* étudiées ont donné le même profil.

Tableau X : Identification de *Staphylococcus xylosus*

Espèces / **Caractères**	***Staphylococcus xylosus***	***Staphylococcus cohnii sp urealyticum***	***Staphylococcus saprophyticus***	**X (*Staphylococcus xylosus probable*)**
Gram	100 %	100 %	100 %	+
Catalase	100 %	100 %	100 %	+
Oxydase	0 %	0 %	0 %	-
Mannitol	90 %	94 %	88 %	+
Coagulase	0 %	0 %	0 %	-
D Nase	0 %	0 %	0 %	-
UREE	90 %	99 %	65 %	+
ADH	5 %	0 %	30 %	-
Xylose	82 %	0 %	0 %	+

+ = (f) ; - = (1-f)

Probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *Staphylococcus xylosus* : 0,63
- X appartienne à *Staphylococcus cohni sp urealyticum* : 0
- X appartienne à *Staphylococcus saprophyticus* : 0

Probabilité relative pour que :

- X appartienne à *Staphylococcus xylosus* : 100 %
- X appartienne à *Staphylococcus cohni sp urealyticum* : 0 %
- X appartienne à *Staphylococcus saprophyticus* : 0 %

La probabilité relative pour que X appartienne à l'espèce *Staphylococcus xylosus* est de 100 %. Notre démarche a permis une excellente identification de *Staphylococcus xylosus*.

II.3. – IDENTIFICATION DE *STAPHYLOCOCCUS COHNII*

Les souches de *Staphylococcus cohnii* étudiées ont donné deux profils différents : 5 sont urée positive et 1 est urée négative.

Tableau XI : Identification de *Staphylococcus cohnii*

Espèces / **Caractères**	***Staphylococcus cohnii sp urealyticum***	***Staphylococcus cohnii sp cohnii***	***Staphylococcus xylosus***	**X_1 (*Stapyloccoccus cohnii probable*)**	**X_2 (*Staphylococcus cohnii* probable)**
Gram	100 %	100 %	100 %	+	+
Catalase	100 %	100 %	100 %	+	+
Oxydase	0 %	0 %	0 %	-	-
Mannitol	94 %	88 %	90 %	+	+
Coagulase	0 %	0 %	0 %	-	-
D Nase	0 %	0 %	0 %	-	-
UREE	99 %	65 %	90 %	**[+]**	**[-]**
ADH	0 %	30 %	5 %	-	-
ONPG	0 %	1 %	10 %	-	-
XYL	0 %	0 %	82 %	-	-
SAC	0 %	96 %	87 %	-	-

+ = (f) ; - = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X_1 appartienne à *Staphylococcus cohnii sp urealyticum* : 0,93
- X_1 appartienne à *Staphylococcus cohnii sp cohnii* : 0,008
- X_1 appartienne à *Staphylococcus xylosus* : 0,016

La probabilité relative pour que :

- X_1 appartienne à *Staphylococcus cohnii sp urealyticum* : 97,48 % ;
- X_1 appartienne à *Staphylococcus cohnii sp cohnii* : 0,8 % ;
- X_1 appartienne à *Staphylococcus xylosus* : 1,6 %.

La probabilité relative pour que X_1 soit *Staphylococcus cohnii sp urealyticum* est de 96,87 %. Ce qui veut dire que l'espèce *Staphylococcus cohnii* identifiée à partir de l'algorithme est bien *Staphylococcus cohnii sp urealyticum.*

L'algorithme a donc permis une très bonne identification de *Staphylococcus cohnii*.

La probabilité absolue pour que :

- X2 appartienne à *Staphylococcus cohnii sp urealyticum* : 0,0094 ;
- X2 appartienne à *Staphylococcus cohnii sp cohnii* : 0,836 ;
- X2 appartienne à *Staphylococcus xylosus* : 0,01.

La probabilité relative pour que :

- X2 appartienne à *Staphylococcus cohnii sp urealyticum* : 1,09 % ;
- X2 appartienne à *Staphylococcus cohnii sp cohnii* : 97,73 % ;
- X2 appartienne à *Staphylococcus xylosus* : 1,16 %.

L'algorithme nous a donc permis de bien identifier une souche de *cohnii* urée négative avec une probabilité de 97,48 %.

II.4. – IDENTIFICATION DE *STAPHYLOCOCCUS CAPITIS*

Les trois souches de *Staphylococcus capitis* étudiées ont donné le même profil.

Tableau XII : Identification de *Staphylococcus capitis*

Espèces / **Caractères**	***Staphylococcus auricularis***	***Staphyloccoccus capitis***	***Staphylococcus haemolyticus***	**X (*Staphylococcus capitis probable*)**
Gram	100 %	100 %	100 %	+
Catalase	100 %	100 %	100 %	+
Oxydase	0 %	0 %	0 %	-
Mannitol	9 %	36 %	60 %	+
Coagulase	0 %	0 %	0 %	-
D Nase	0 %	0 %	4 %	-
UREE	1 %	35 %	1 %	-
ADH	90 %	85 %	85 %	+
VP	1 %	90 %	57 %	+
ONPG	0 %	0 %	13 %	-
TRE	90 %	2 %	91 %	-

+ = (f) ; **- = (1-f)**

La probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *Staphylococcus auricularis* : $8{,}02.10^{-5}$
- X appartienne à *Staphylococcus capitis* : 0,17
- X appartienne à *Staphylococcus haemolyticus* : $2{,}16.10^{-2}$

La probabilité relative pour que :

- X appartienne à *Staphylococcus auricularis* : 0,04 %
- X appartienne à *Staphylococcus capitis* : 89,47 %
- X appartienne à *Staphylococcus haemolyticus* : 11,84 %

L'algorithme a permis une identification acceptable de *Staphylococcus capitis* avec une probabilité relative de 89,47 %.

II.5. – IDENTIFICATION DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Les deux souches de *Streptococcus pneumoniae* étudiées ont donné le même profil.

Tableau XIII : Identification de *Streptococcus pneumoniae*

Espèces / **Caractères**	***Streptococcus pneumoniae***	***Streptococcus sanguis***	***Streptococcus mitis***	**X (*Streptococcus pneumoniae probable*)**
Gram	100 %	100 %	100 %	+
Catalase	0 %	0 %	0 %	-
Bile esculine	0 %	0 %	0 %	-
BHS	0 %	0 %	0 %	-
β HEM	1 %	0 %	0 %	+
Sels biliaires	98 %	0 %	0 %	+
Optochine	90 %	0 %	0 %	+
VP	0 %	0 %	0 %	-
ESC	39 %	42 %	3 %	-
ADH	57 %	90 %	99 %	+
RAF	87 %	55 %	31 %	+
TRE	98 %	98 %	1 %	+

+ = (f) ; - - = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *Streptococcus pneumoniae* : $2{,}6.10^{-3}$
- X appartienne à *Streptococcus mitis* : 0
- X appartienne à *Streptococcus sanguis* : 0.

La probabilité relative pour que :

- X appartienne à *Streptococcus pneumoniae* : 100 %
- X appartienne à *Streptococcus mitis* : 0 %
- X appartienne à *Streptococcus sanguis* : 0 %

La probabilité relative pour que X soit *Streptococcus pneumoniae* est de 100 %. L'algorithme établi a permis donc une excellente identification de *Streptococcus pneumoniae*.

II – 6 – IDENTIFICATION DE *STREPTOCOCCUS MITIS*

Les deux souches étudiées ont donné le même profil.

<u>Tableau XIV</u> : Identification de *Streptococcus mitis*

Espèces / **Caractères**	***Streptococcus mitis 1***	***Streptococcus mitis 2***	***Streptococcus sanguis***	**X (*Streptococcus mitis* probable**
Gram	100 %	100 %	100 %	+
Catalase	0%	0 %	0 %	-
Bile esculine	0 %	0 %	0 %	-
BHS	0 %	0 %	0 %	-
β HEM	0 %	0 %	0 %	-
Sels biliaires	0 %	0 %	0 %	-
VP	1 %	0 %	0 %	-
ESC	3 %	3 %	42 %	-
ADH	19 %	99 %	90 %	-
RAF	26 %	31 %	55 %	-

+ = (f) ; - = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *Streptococcus mitis 1* : 0,57
- X appartienne à *Streptococcus mitis 2* : $6{,}7.10^{-3}$
- X appartienne à *Streptococcus sanguis* : 0,026

La probabilité relative pour que :

- X appartienne à *Streptococcus mitis 1* : 95 % ;

- X appartienne à *Streptococcus mitis 2* : 1,11 % ;

- X appartienne à *Streptococcus sanguis* : 4,3 %.

La probabilité relative pour que X appartienne à *Streptococcus mitis 1* est 95 %. Donc l'algorithme a permis une identification acceptable de *Streptococcus mitis*.

II.7. – IDENTIFICATION DE *STREPTOCOCCUS MILLERI*

Les deux souches de *Streptococcus milleri* étudiées ont donné le même profil. On parle de groupe « *milleri* ».

Tableau XV : Identification de *Streptococcus milleri*

Espèces / **Caractères**	***Streptococcus intermedius***	***Streptococcus salvarius***	***Streptococcus mutans***	**X (*Streptococcus milleri* probable)**
Gram	100 %	100 %	100 %	+
Catalase	0 %	0 %	0 %	-
Bile esculine	0 %	0 %	10 %	-
BHS	0 %	0 %	0 %	-
β HEM	40 %	1 %	1 %	-
Sels biliaires	0 %	0 %	0 %	-
VP	100 %	85 %	99 %	+
ESC	87 %	98 %	99 %	+
ADH	100 %	0 %	18 %	+
INU	3 %	34 %	81 %	-

+ = (f) ; - = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *Streptococcus intermedius* : 0,51 ;

- X appartienne à *Streptococcus salvarius* : 0 ;

- X appartienne à *Streptococcus mutans* : 0,03.

La probabilité relative pour que :

- X appartienne à *Streptococcus intermedius* : 94,44 % ;

- X appartienne à *Streptococcus salvarius* : 0 % ;

- X appartienne à *Streptococcus mutans* : 5,5 %.

La probabilité relative pour que l'espèce du groupe *milleri* identifié appartienne à *Streptococcus intermedius* est de 94,44 %. L'algorithme nous a permis de bien identifier *Streptococcus milleri*.

D'autres calculs effectués ont également montré que la probabilité relative pour que cette espèce appartienne à *Streptococcus anginosus* est de 95,3 %. La différence n'est pas significative.

Comme tout processus de diagnostic microbiologique, nous avons commencé par une validation des méthodes d'identification grâce à l'utilisation de souches de référence garantissant l'efficacité des différents milieux d'isolement, galeries d'identification et autres tests utilisés.

I – MISE AU POINT DES ALGORITHMES

Les caractères retenus étaient ceux qui étaient susceptibles et indispensables de permettre une bonne identification.

I.1. – CARACTERES D'IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE

Sur les 17 caractères retenus dans l'algorithme d'identification des staphylocoques coagulase négative :

- 2 étaient nécessaires au diagnostic de famille : Gram et catalase

- 3 au diagnostic du genre : recherche de l'oxydase, fermentation du glucose, type respiratoire

- 12 au diagnostic d'espèces : coagulase, DNase, fermentation du mannitol, novobiocine, urée, ADH, VP, ONPG, lactose, xylose, mannose, tréhalose.

I.2. – CARACTERES D'IDENTIFICATION DES STREPTOCOQUES NON GROUPABLES

Sur les 14 caractères retenus dans l'algorithme d'identification des streptocoques non groupables :

- 2 étaient nécessaires au diagnostic de famille : Gram et catalase ;

- 2 au diagnostic de genre : croissance sur bile esculine et sur BHS ;

- 10 au diagnostic d'espèces : hémolyse, sensibilité à l'optochine, lyse par la bile, VP, ESC, ADH, raffinose, inuline, tréhalose, mannitol.

II – IDENTIFICATION

II.1. – LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE

Les staphylocoques se développent bien sur gélose au sang ordinaire en donnant des colonies distinctes, isolées.

D'après Brun Y., BES M. **[12]**, le diagnostic du genre comprend la réalisation d'un ou de plusieurs de ces tests : fermentation du glucose, acidification du glycérol, recherche de l'oxydase, sensibilité à la lysostaphine.

C'est ainsi que NDAO S.K. **[54]** dans son pedigree d'identification des staphylocoques, a utilisé la fermentation du glucose et l'acidification du glycérol.

PILET C., BOURDON J.L. et Coll. **[56]** ont utilisé la catalase, l'ADH et la fermentation de nombreux hydrates de carbone pour le diagnostic de genre. Cette méthode utilisée doit être remise en question parce que toutes les souches appartenant au genre *Staphylococcus* ne sont pas ADH positif.

Les caractères retenus pour le diagnostic du genre dans notre algorithme sont de réalisation facile et rapide.

La coagulase et la DNase sont des caractères complémentaires nécessaires à une bonne identification. Cependant, l'API staph ne fait la différence entre *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus sciuri* qu'avec la production d'ADH, d'uréase et de coagulase **[54]**.

En effet, il présente des données qui montrent que 20 % et 17 % des *Staphylcoccus aureus* peuvent ne pas produire d'ADH ou d'uréase respectivement.

Ces discordances montrent la nécessité de procéder en première intention à la recherche de l'oxydase, de la DNase et de la coagulase et non de les rechercher en dernier recours comme il a été souligné par certains auteurs **[2]**.

C'est ainsi que notre algorithme va permettre une identification correcte de ces espèces car tenant compte en première intention de tous ces caractères (oxydase, coagulase, DNase).

Pour l'identification biochimique, certains caractères de la microméthode d'identification ne sont pas directement impliqués : ce sont l'ODC et le nitrate.

Ce constat rejoint le choix de NDAO S.K. **[54]** qui, dans son pedigree, n'a pas utilisé l'ADH et le nitrate car ils n'ont pas été jugés nécessaires, de même dans la galerie API Staph **[41]** l'ODC n'y figure pas.

Par contre, l'étude de ces caractères est retrouvée dans la plupart des microméthodes existant sur le marché, à l'instar du System Micro Scan **[32]**, du système auto-microbic d'identification des Gram positifs **[2]**.

La plupart des souches de *Staphylococcus cohnii* étudiées ont donné une uréase fortement positive. Ce phénomène s'explique par le fait que ces espèces possèdent une uréase très active qui entraîne la libération d'ions ammonium qui alcalinisent le milieu, et donc virage de l'indicateur de l'orange au rose framboise.

Cependant, une des souches de *Staphylococcus cohnii* testée a donné une urée négative. Cette souche urée négative a été bien identifiée comme étant *Staphylococcus cohnii sp cohnii* avec une probabilité relative de 99,2 %.

Cette variation pourrait être due à des mutations ponctuelles au niveau du gène codant pour la synthèse de l'enzyme qui dégrade le substrat. Ces mutations consistent soit à une interversion de la position des bases qui constituent les codons, soit à une perte d'une base.

Dans tous les cas, l'enzyme ne sera pas synthétisée et les bactéries vont perdre leur capacité de métaboliser les substrats correspondants.

En effet, le génome des bactéries est constitué d'un seul chromosome et toute mutation, aussi minime soit-elle, se traduit directement par un phénomène visible comme l'absence de métabolisme d'un substrat donné. Les bactéries ne possèdent pas un deuxième chromosome qui pourrait compenser les mutations subies par le premier **[19]**.

D’après les résultats obtenus, nous pouvons dire que notre algorithme garantit une bonne identification des staphylocoques à coagulase négative les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine. Ainsi pour l’identification des espèces rarement rencontrées en pathologie, comme par exemple *Staphylococcus lugdunensis*, il faut tenir compte de l’ODC qui est un caractère majeur d’identification de cette espèce **[38]**.

II.2. – LES STREPTOCOQUES NON GROUPABLES

Les streptocoques non groupables ont été isolés sur gélose au sang de mouton additionné de chlorhydrate de pyridoxal. Ces streptocoques poussent visiblement bien sur cette gélose avec des colonies isolées, distinctes α ou non hémolytiques.

En particulier, le pneumocoque qui présente certaines exigences, a été bien isolé sur gélose au sang cuit plus gentamicine.

Cependant, certains auteurs comme DIOP F. **[18]**, avait utilisé le CLED et la gélose au chlorhydrate de pyridoxal pour isoler ces streptocoques. Il faut noter que l’isolement sur CLED n’a pas beaucoup d’importance car ce milieu ne nous donne aucune information sur le type d’hémolyse qui est un caractère fondamental pour l’identification des streptocoques non groupables.

Donc la gélose au chlorhydrate de pyridoxal reste le milieu de choix pour l’identification des streptocoques non groupables.

D’après FACKLAM et Coll. **[23]**, cinq caractères permettent de déterminer avec une approximation intéressante le groupe des streptocoques les plus souvent rencontrés. Au sujet de ces tests de présomption, il faut souligner que la totalité des *Listeria* donne une réaction positive avec le milieu Bile esculine et que 2/3 des souches de *Listeria* hydrolysent l’hippurate. Ce constat nous rappelle l’importance de la recherche de la catalase pour l’identification d’un streptocoque, comme décrit dans notre algorithme, pour éviter des confusions.

Le milieu bile esculine ne doit pas être confondu avec le milieu à l'esculine qui ne doit pas être utilisé comme test de présomption. La culture et le noircissement du milieu bile esculine est très spécifique des entérocoques et des streptocoques du groupe D.

Il faut noter que parmi les streptocoques non groupables, des souches bile esculine positive peuvent s'observer avec certaines souches de *Streptococcus mutans*. Ceci avait été par le passé cause de confusion avec les streptocoques du groupe D, en particulier *Streptococcus bovis* **[4]**.

L'étude de l'hémolyse est fondamentale pour l'identification d'un streptocoque car elle oriente la démarche à suivre.

La sensibilité à l'optochine et la lyse par la bile ont été recherchées sur les colonies α-hémolytiques et non hémolytiques.

Nous avons eu d'abord recours au test de sensibilité à l'optochine. Ce test nous a permis de faire le diagnostic différentiel avec les streptocoques α-viridans qui sont résistants à l'optochine.

Néanmoins, afin de nous assurer que ces derniers n'étaient pas des pneumocoques résistants à l'optochine décrits par certains auteurs **[35, 43, 64]**, nous avons utilisé la lyse par les sels biliaires. Le test de solubilité dans la bile est en effet le test le plus fiable d'identification du pneumocoque.

Nous pouvons dire que le test de solubilité dans la bile est un caractère fondamental nécessaire pour une bonne identification des streptocoques non groupables.

Les streptocoques α et non hémolytiques qui ne sont pas lysés par la bile et résistants à l'optochine sont des streptocoques non groupables, autre que *Streptococcus pneumoniae*.

L'algorithme a permis une excellente identification de *Streptococcus pneumoniae*.

Streptococcus milleri, *Streptococcus mitis* et *Streptococcus sanguis* ont été bien identifiés.

Cependant, les caractères biochimiques retenus ne suffisent pas pour différencier *Streptococcus mitis et Streptococcus sanguis*. Ces deux espèces ont beaucoup de caractères semblables et ne se différencient que par le raffinose. Cette limite est également retrouvée dans la galerie API.

De même, l'algorithme nous a permis de bien identifier le groupe *milleri* mais il ne nous permet pas d'identifier les différentes espèces de ce groupe.

Pour cette raison, les méthodes DNA-DNA hybridation et GC % qui donnent de bons résultats doivent être utilisées. Mais l'inconvénient est que ces méthodes demandent des moyens financiers énormes.

Les infections bactériennes dues aux staphylocoques à coagulase négative et aux streptocoques non groupables, si diverses dans leurs manifestations cliniques, sont aujourd'hui parmi les plus fréquentes.

Le diagnostic microbiologique et le traitement de ces infections imposent l'identification correcte de l'agent étiologique en vue d'une bonne prise en charge thérapeutique.

C'est dans cette optique que nous avons entrepris l'élaboration d'algorithmes d'identification des staphylocoques à coagulase négative et des streptocoques non groupables.

Pour valider le processus d'identification, nous avons utilisé une approche comprenant trois phases essentielles :

- la première phase a consisté en la validation des méthodes d'identification grâce à l'utilisation de souches de référence garantissant l'efficacité des différents milieux d'isolement, galeries d'identification et autres tests utilisés ;

- la deuxième phase a permis de valider la théorie bayésienne qui repose sur la sensibilité et la spécificité des méthodes grâce à l'utilisation de souches appartenant à différentes espèces bactériennes ;

- enfin, une troisième phase de notre démarche reposant sur l'évaluation des algorithmes d'identification.

Dans notre démarche, les caractères retenus étaient ceux qui étaient nécessaires et indispensables à une bonne identification ; nous avons commencé d'abord par identifier la famille, ensuite le genre et enfin l'espèce.

Pour les staphylocoques à coagulase négative, 17 caractères étaient retenus pour le diagnostic microbiologique.

Certains caractères comme le Gram, la catalase, la recherche de l'oxydase, du type respiratoire, de la fermentation du glucose, de la coagulase et de la DNase sont indispensables pour l'orientation diagnostique.

Les caractères biochimiques viennent en deuxième position, ceci pour éviter d'éventuelles confusions.

Toutes les souches de staphylocoques ont été bien identifiées à partir de l'algorithme avec une probabilité relative de 94,2 % pour *Staphylococcus warneri*, 100 % pour *Staphylococcus xylosus*, 97,48 % et 97,73 % pour *Staphylococcus cohnii*, 89,47 % pour *Staphylococcus capitis*.

Pour les streptocoques non groupables, 14 caractères étaient retenus pour le diagnostic de famille, de genre et d'espèces.

Les caractères suivants : Gram, catalase, croissance sur bile esculine et sur BHS, optochine, sels biliaires étaient indispensables pour l'identification d'un streptocoque non groupable au laboratoire.

L'algorithme a permis de bien identifier les streptocoques non groupables avec une probabilité relative de 100 % pour *Streptococcus pneumoniae*, 95 % pour *Streptococcus mitis*, 94,44 % et 95,3 % pour *Streptococcus milleri*.

Cependant, l'algorithme ne permet pas l'identification des différentes espèces du groupe « *milleri* ». Pour cette raison, certaines méthodes modernes en particulier celles permettant une étude précise de la GC% ou du potentiel génomique, sont de plus en plus recommandées et utilisées pour la différenciation d'espèces ou de sous-espèces à croissance difficile

Toutefois, les algorithmes établis garantissent une bonne identification des staphylocoques à coagulase négative et des streptocoques non groupables les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine.

1 - ALBERT B., WILLIAM J.H., KENNETH L.H., HENRY D.I., SHADOMY H. J.

Manual of clinical microbiology.

AMS, 1991, 5th edition : 233-244.

2 - ALMEIDA J., JORGENSEN J. H., and JOHNSON J. E.

Evaluation of the Auto Microbic System Gram Positive.

Identification of coagulase negative staphylococci.

J. Clin Microbiol, 1993, 18 (2) : 438-439.

3 - AVRIL J. L., DABENAT H., DENIS F., MONTEIL H.

Bactériologie clinique.

Edition Marketing, Paris, 1988 : 49-52.

4 – AVRIL J. L., PLAISANCE J.

Caractères culturaux et biochimiques des streptocoques.

Sensibilité aux antibiotiques.

Méd. Mal. Infect., 1980, 10 : 627-632.

5 - AZELE FERRON

Bactériologie Médicale

Edition C et R (13ème) ; 1998.

6 - BAKER J. S.

Comparaison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci.

J. Clin Microbiol. Rev., 1984, 19 : 875-879.

7 - BAKHOUM I. M. N. S.

Contrôle de qualité et validation des différentes microméthodes d'identification bactérienne.

Thèse Pharm., Dakar, 2004 n° 08.

8 - BANNERMAN T. L., KLEEMAN K. T., KLOOS W. T.

Evaluation of the vitek system Gram positive.

Identification card for species identification of coagulase negative staphylococci.

J. Clin Microbiol, 1993, 31 (5) : 1322-1325.

9 - BES M., FRENEY J., BRUN Y., FLEURETTE J.

Identification des staphylocoques au laboratoire de microbiologie clinique

Lyon Pharm., 1989, 41, 1 : 37-46.

10 - BOUVET A. et ACAR J. F.

Isolement et études des streptocoques cultivant en satellitisme. Mise en évidence au cours des endocardites bactériennes.

INSERM, 1997, 65 : 327-338.

11 - BOYE C. S., NDAO S. K., GASSAMA A., KAIRE O., MACONDO E. DABO L., DIOP M. M., MBOUP S.

Microméthodes d'identification des entérobactéries, des staphylocoques, des streptocoques et des mycoplasmes.

J. OAPI / OMPI, 1 998, 26 : 32-35.

12 - BRUN Y., BES M.

Méthodes diagnostiques des staphylocoques à coagulase négative

Méd. et Mal. Infect., 1990, hors série Mars : 16-23.

13 - CIUPEK C., PANGON B., GHNASSIA J. C.

Staphylocoques à coagulase négative : habitat, pouvoir pathogène, Identification, résistance aux antibiotiques.

Feuillets de Biologie : (Paris), 2002, 43, 245 : 19-29.

14 - COLY I.

Microméthodes d'identification biochimique des bactéries.

Mémoire Sciences, 1999.

15 - COYKENDALL A. L.

Classification and identification of the *viridans streptococci*.

J. Clin. Microbiol Rev., 1989, 2 : 315-328.

16 - COYKENDALL A. L., WESBECKER P. M., GUSTAFAON K. B.

Genetic Similarities among four species of *Streptococcus* : *S. milleri, S. anginosus, S. constellatus* and *S. intermedius*.

Int J. Syst Bacteriol, 1987, 37 : 222-228

17 - DENIS F., SAMBA A., CHIRON J. P., DIOP MAR I.

Infections à streptocoques en Afrique vues par les laboratoires.

Bull. Soc. Méd. Afr., 1978, 23 : 347-350.

18 - DIOP F.

Données sur la sensibilité aux antibiotiques des souches de streptocoques déficients isolées d'infections respiratoires, ostéo articulaires et cardiovasculaires.

Thèse Pharm., Dakar, 2002, n° 67.

19 - DIOUF M.F.

Evaluation de différentes méthodes de conservation des souches bactériennes exigeantes.

Thèse Pharm., Dakar, 2004, n° 13.

20 - Encyclopédie médicale de la famille

Larousse, sélection du Reader's Digest, 1991.

21 - FACKLAM R.

What happened to the streptococci : overview of taxonomic and nomenclature changes.

J. Clin. Microbiol. Rev, 2002, 15 : 613-630.

22 - FACKLAM R., ELLIOT J. A.

Identification, classification and clinical relevance of catalase negative, Gram positive cocci excluding the *streptococci* and *enterococci*.

J. Clin Microbiol., 1995, 8 : 479-495.

23 - FACKLAM R. R., THACKER L. G., FOX B., ERIQUEZ L.

Presumptive identification of streptococci with a new test system.

J. Clin Microbiol., 1982 ; 15 : 987-990.

24 - FLEURETTE J.

Staphylocoques et Microcoques.

Dans le Minor L., Veynon M., Bacterio Med.

Flammarion Méd. - Sciences ; Paris 1er ed, 1982 : 773-792.

25 - FLEURETTE J.

Taxonomie et écologie des staphylocoques.

Méd. Mal. Inf., 1990, hors série Mars : 6-15

26 - FRENEY J., RENAUD F., HANSEN W., BOLLET C.

Précis de bactériologie Clinique.

Edition ESKA, Paris 2000 : 783-830.

27 - GALLIS H. A.

Viridans and beta haemolytic (non group A, Band D) streptococci.

In : G. L. Mandel, R. G. Douglas, J. E. Bennett (eds).

Principals and practice of infections diseases, 3 rd ed, Churchill, Livingstone, ed ; New York, 1990 : 1563-1572.

28 - HARDIE J. M.

Genus streptococcus.

Bergey's Manual of systematic bacteriology, Baltimore : Williams & wilkins, 1986, 2 : 1043-1077.

29 - HORAUD T., LE BOUGUENEC C.

Streptococcaceae.

In : Le Minor L., Veron M. eds

Bactériologie Médicale, Médecine Sciences Flammarion, Paris, 1990, 2è ed : 795-834.

30 - HORODNICEANU T., DELBOS F.

Les streptocoques non groupables dans les infections humaines Identification et sensibilité aux antibiotiques.

Ann Microbiol. (Inst Pasteur), 1982, 1336 : 255-269.

31 - HOUNKPONOU E.

Etude comparée de l'identification et de la sensibilité de *Streptococcus pneumoniae* et *Strepcoccus pyogenes* isolés d'infections humaines (données prospectives à Dakar).

Thèse Pharm., Dakar, 2003, n° 42.

32 - HUSSAIN Z., STOAKES L., STEVENS D. L., SCHIEVEN B.C., LANNIGAN R., JONES C.

Comparaison of the Micro Scan System with API Staph Ident.

System for species identification of coagulase negative staphylococci.

J. Clin. Microbiol., 1986, 23 (1) : 126-128.

33 - JACQUES C.

Les systèmes automatiques d'identification bactérienne.

Précis de Bactériologie Clinique, 2000, 6 ; 147p.

34 - KECHRID A., BEN REDJEB S., GARGOURI J., FENDRI C., BEN HASSEN E., BOUJNAH A.

Les streptocoques non groupables : Identification sensitivité aux antibiotiques.

Médecine Tropicale, 1991, 51, 2 : 181-184.

35 - KELLOGG J. A., BANKERT D. A., ELDER C. J., GIBBS J. L., SMITH M. C.

Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited.

J. Clin Microbiol, 2001, 39 : 3373-3375.

36 - KLOOS W. E. and BANNERMAN T. L.

Staphylococcus and Micrococcus

In : P. R. Murray, E.J. Barron, M.P. Faller, F.C. Tenover and R.H. Yolken (eds)

Manual of Clinical Microbiology, Washington, 1995, 6th ed, ASM Press : 282-298.

37 - KLOOS W. E. and BANNERMAN T. L.

Update on Clinical significance of coagulase negative staphylococci.

J. Clin Microbiol Rev., 1994 ; 7 : 117-140.

38 - KLOOS W. E. and LAMBE J. R. D. W.

Staphylococcus.

In : Manual of Clinical Microbiology, 4 th ed.

Am. Soc. For Microbiology,Washington DC, 1981 : 222-235.

39 - KLOSS W. E. and SCHLEIFER K. H.

Genus Staphylococcus.

Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, Baltimore : Williams and Wilkins, 1986, 2 : 1013-1035.

40 - KLOOS W. E., SCHLEIFER K.H.

Simplified scheme for routine identification of human staphylococcus species.

J. Clin. Microbiol., 1975, 1 : 82-88.

41 - KLOSS W. E. and WOLFSHOAL J. F.

Identification of *Staphylococcus* with API staph.

J. Clin Microbiol., 1982, 16 (3) : 503-516.

42 - KONATE B.

Microméthodes d'identification et d'étude de la sensibilité des staphylocoques, entérocoques et streptocoques.

Intérêt et application dans le diagnostic rapide des infections microbiennes.

Thèse Pharm., Dakar, 2001 n° 100.

43 - KONTIAINEN S., SIVONEN A.

Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from blood and midde ear fluid.

Eur J. Clin Microbiol., 1987, 6 : 422-424.

44 - LE MINOR L., VERON M.

Bactériologie Médicale.

Flammarion Méd.-Science, Paris 1989.

45 - LEMOZY J. et SUC C.

Actualités sur les streptocoques et entérocoques.

Données taxonomiques et identification.

Feuillets de Biologie, 1997 : 15-22.

46 - MARA M.

Etude des maladies streptococciques en Afrique Occidentale.

Thèse Méd, Dakar, 1973 n° 26.

47 - MARCHAL N., BOURDON J. L., RICHARD C. L.

Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.

Doins Editeurs, Paris, 1987.

48 - MARCHOU B., LEMOZY J.

Infection à streptocoques.

Editions Techniques Encycl. Med. Chir., (Paris-France), *Maladies Infectieuses*, Pédiatrie, 8-009 A-10 et 4-250 A-20, 1993, 20 p.

49 - MILLER J. M., O'HARA M. C.

Substrate utilization systems for the identification of bacteria and yeasts : in diagnostic technologies in clinical Microbiology.

ASM Press, Washington DC, 1995, 6ème eds : 103-109.

50 - MINTO E. C., BARELLI C., MARTINEZ R., DA COSTA DARINI A.

Identification and medical importance of coagulase negative *Staphylococci* species.

Med. J., Sao Paulo, 1999 Jul 1 ; 117 (4) : 175-178.

51 - MOUDEWHENOU E. M.

Place des germes non exigeants et les bactéries anaérobies dans les infections respiratoires basses à Dakar.

Thèse Pharm., Dakar, 2000, n° 90.

52 - MOUNIER M., DENIS F.

Les cocci à Gram positif : Bactériologie Médicale, Techniques Usuelles.

SIMEP (ed), Paris, 1987, 105-116.

53 - MURRAY H. W., GROSS K. C., MASUR H. and al.

Serious infections caused by *Streptococcus milleri*.

Amer. J. Med., 1978, 64 : 759-764.

54 - NDAO S. K.

Mise au point d'une microméthode d'identification biochimique des staphylocoques.

Thèse Pharm., Dakar, 1999 n° 44.

55 - NOVICK R. P.

Staphylococci.

In : *Microbiology*, 4 th ed., NY, 1990 : 539-560.

56 - PILET C., BOURDON J. L., TOMA B., MARCHALL N., BALBASTRE C.

Bactériologie Médicale et vétérinaire.

Systématique bactérienne.

Doins Editeurs, Paris, 2ème ed. 1983.

57 - PINA G., RAYMOND D.

Critères de choix d'une méthode d'identification.

DES Bactériologie- Virologie ; 2003 : 1-27.

58 - POTEL G., BARON D.

Infections à staphylocoques.

EMS Mal infect., 8001 A 10, 1990.

59 - RIEGEL P.

Actualités de l'identification des streptocoques.

Spectra Biologie, 1999, 18, 102 : 23-26.

60 - RUOFF K. L.

Streptococcus anginosus (« *Streptococcus milleri* »).

The unrecognised pathogen.

Clin Microbiol Rev, 1998, 1 : 102-108.

61 - SCHLEGEL L., BOUVET A.

Streptocoques et germes apparentés.

Bull. Soc for Microbiol, 1996.

62 - SCLEIFER K. H., KILPPER BALZ R.

Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enteroccoci and lactococci : a review.

System Appl Microbiol, 1987, 10 : 1-19.

63 - THIAW C.

Bactériologie des rhinopharyngites purulentes de l'enfant au Sénégal.

Thèse Pharm., Dakar, 1995, n° 73.

64 - VAN DER AUWERA P.

Clinical significance of *S. milleri.*

Eur J. Clin Microbiol, 1985, 4 : 386-390.

65 - WAHL et MEYER P.

Les épreuves dites « biochimiques » pour l'identification des streptocoques.

Ann. Inst. Pasteur, 1956, 91 : 147-164.

66 - WHILEY R. A., BREIGHTON D.

Emended descriptions and recognition of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus anginosus*, as distinct species.

Bacteriol., 1991, 41 : 1-5.

RESUME

Les infections à staphylocoques sont ubiquitaires et représentent un pourcentage important des infections graves.

Considérés depuis des années comme des germes commensaux de la peau et des muqueuses, les staphylocoques coagulase négative sont actuellement reconnus comme des agents majeurs d'infections nosocomiales.

Les streptocoques non groupables sont des commensaux de la cavité buccale (dont ils représentent 30 à 60 % de la flore bactérienne), de l'intestin, de la peau et des voies génitales. Ces streptocoques jouent un rôle étiologique prédominant dans la formation des caries dentaires et des parodontopathies.

Le diagnostic microbiologique et le traitement de ces infections imposent l'identification correcte de l'agent étiologique en vue d'une bonne prise en charge thérapeutique.

C'est dans cette optique que nous avons entrepris l'élaboration d'algorithmes d'identification des staphylocoques à coagulase négative et des streptocoques non groupables.

Pour valider le processus d'identification, nous avons utilisé une approche comprenant trois phases essentielles :

- la première phase a consisté en la validation des méthodes d'identification grâce à l'utilisation de souches de référence garantissant l'efficacité des différents milieux d'isolement, galeries d'identification et autres tests utilisés ;

- la deuxième phase a permis de valider la théorie bayésienne qui repose sur la sensibilité et la spécificité des méthodes grâce à l'utilisation de souches appartenant à différentes espèces bactériennes ;

- enfin, une troisième phase de notre démarche reposant sur l'évaluation des algorithmes d'identification.

Dans notre démarche, les caractères retenus étaient ceux qui étaient nécessaires et indispensables à une bonne identification ; nous avons commencé d'abord par identifier la famille, ensuite le genre et enfin l'espèce.

Toutefois, les algorithmes établis garantissent une bonne identification des staphylocoques à coagulase négative et des streptocoques non groupables les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine.